



Antioksidatif estrogen dalam menghambat *advanced oxidation protein product* akibat reaksi glikosilasi

Role of antioxidative estrogen as inhibitor of advanced oxidation protein product generated by glycosylation reaction

Adenan¹, Eko Suhartono², Bambang Setiawan²

¹Department of Public Health Lambung Mangkurat University School of Medicine, Banjarbaru

²Department of Medical Chemistry-Center for Free Radical and Natural Product Studies, Lambung Mangkurat University School of Medicine, Banjarbaru

KEYWORDS H_2O_2 scavenging; $\bullet OH$ scavenging; metal chelating; ethinyl estradiol

ABSTRACT Ethinyl estradiol is an estrogen derivative used as contraceptive or hormone replacement therapy to maintain woman's sexual function. The aim of this study was to examine ethinyl estradiol antioxidative activity and its potency to inhibit protein oxidation by glycosylation reaction. This study was an *in vitro* assay and its antioxidative activity by H_2O_2 scavenging, $\bullet OH$ scavenging, metal chelating were measured. Activity as inhibitor of Advanced Oxidation Protein Products (AOPP) was carried out by using glycosylation reaction. Three groups ($n=6$), i.e P0 control (3 ml of serum), P1 (3 ml of serum + glucose 500 mM), and P2 (3 ml of serum + glucose 500 mM + ethinyl estradiol 0,15gr/100mL) were used in this study. The result of this study showed that H_2O_2 scavenging, $\bullet OH$ scavenging, metal chelating were 48,889%, 15,139%, 11,538% respectively. For AOPP inhibition, P0 and P1 was different significantly ($p<0,05$), P0 and P2 was not different significantly ($p>0,05$), and P1 and P2 was different significantly ($p<0,05$). It was suggested that antioxidative mechanism from ethinyl estradiol could inhibit AOPP formation generated by glycosylation reaction.

Estrogen merupakan hormon yang dihasilkan oleh ovarium dan berguna untuk pembentukan ciri-ciri perkembangan seksual pada wanita, misalnya pembentukan payudara, lekuk tubuh, dan rambut kemaluan. Selain itu, estrogen juga berguna pada siklus menstruasi dengan membentuk ketebalan endometrium, menjaga kualitas dan kuantitas cairan serviks dan vagina sehingga sesuai untuk penetrasi sperma (Santanam dkk, 1998).

Estrogen adalah senyawa steroid C-18 yang dicirikan dengan adanya cincin aromatik, gugus hidroksil fenolik pada C-3, dan gugus hidroksil (estradiol) atau keton (estron) pada C-17 (Wilbraham & Matta, 1992). Penelitian yang berkaitan dengan fungsi estrogen telah banyak dilakukan. Hasil penelitian Wen dkk (2000), mengungkapkan bahwa estradiol mempunyai efek terhadap gen yang bertanggung jawab dalam antiaterogenik, metabolisme lipid dan lipoprotein. Selain itu, estrogen juga berperan dalam menghambat penuaan sel kulit dan munculnya Alzheimer pada wanita menopause (Hall & Phillips, 2005).

Dalam perkembangannya, estrogen dimanfaatkan oleh wanita menopause untuk terapi

sulih hormon. Hasil penelitian Ozden dkk (2001) menyimpulkan bahwa terapi sulih hormon yang menggunakan estrogen terbukti dapat melindungi sel dari kerusakan oksidatif. Pada penelitian tersebut juga diungkapkan bahwa estrogen dapat mencegah komplikasi aterosklerosis (Ozden dkk, 2001).

Selain untuk terapi sulih hormon, estrogen juga digunakan sebagai kontrasepsi. Estrogen dalam bentuk tunggal maupun kombinasi, terbukti efektif sebagai kontrasepsi hormonal. Penelitian sebelumnya mengungkapkan bahwa aktivitas radikal bebas, kadar hemoglobin, dan LDL total wanita akseptor pemakai levonogestrel dan etinil estradiol sebagai kontrasepsi oral tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan wanita nonakseptor (Adenan, 2005).

Correspondence:

Drs. Eko Suhartono, M.Si, Department of Medical Chemistry
Lambung Mangkurat University School of Medicine, Banjarbaru Jl.
A. Yani Km 36, Banjarbaru, South Kalimantan, Fax (0511) 4773470
Hp. 08155047910, email: ekoantioksidan@yahoo.com

Berdasarkan beberapa hasil penelitian sebelumnya, belum pernah diteliti peran estrogen sebagai penghambat *advanced oxidation protein product* (AOPP). Oleh karena itu, perlu diteliti pengaruh etinil estradiol sebagai penghambat AOPP akibat reaksi glikosilasi. Hal ini dilakukan mengingat penggunaan estrogen yang semakin luas, terutama sebagai alat kontrasepsi dan terapi sulih hormon. Selain itu dengan penelitian juga dapat dijelaskan landasan terapi kuratif dan preventif berbagai penyakit degeneratif akibat menopause sehingga kesehatan reproduksi wanita dapat lebih meningkat.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan

Pada penelitian ini digunakan darah yang diperoleh dari sukarelawan pria sehat (enam orang), usia dewasa muda, dan tidak didapatkan kelainan pada pemeriksaan fisik. Sebanyak 10 ml darah diambil dari vena mediana kubiti tanpa puasa sebelumnya, lalu dimasukkan ke dalam tabung yang berisi antikoagulan (EDTA).

Rancangan penelitian

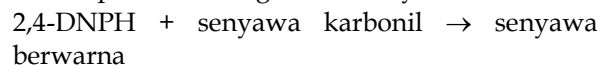
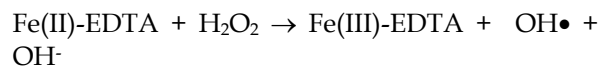
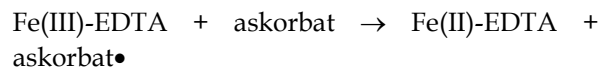
Metode penelitian yang digunakan adalah studi eksperimen dengan rancangan *post test only control group design*. Penelitian ini menggunakan 2 tahap penelitian, yakni tahap pemeriksaan antioksidan etinil estradiol dan tahap pengujian etinil estradiol sebagai penghambat AOPP. Pemeriksaan antioksidan meliputi penangkapan radikal hidroksil, *chelating* logam, dan *scavenger* peroksida. Tahap pengujian penghambatan AOPP oleh etinil estradiol dilakukan pada tiga kelompok, yakni P0 adalah kelompok kontrol, yang terdiri atas 3 ml serum saja; P1 ialah kelompok yang terdiri atas 3 ml serum dan 3 ml glukosa 500 mM, dan P2, yakni kelompok campuran 3 ml serum, 3 ml glukosa 500 mM, dan etinil estradiol 0,15 gr/100 mL. Masing-masing kelompok diinkubasi selama 3 jam, sebelum diperiksa. Penelitian dilaksanakan di laboratorium Kimia/Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat pada bulan Maret-Mei 2006.

Pengukuran penangkapan radikal hidroksil (Metoda DNPH yang dimodifikasi)

Prinsip kerja pengukuran aktivitas penangkapan radikal hidroksil, yakni radikal hidroksil yang dihasilkan dari reaksi antara H_2O_2 dan Fe(III)-EDTA direaksikan dengan penambahan asam askorbat pH 7,4. Penambahan asam askorbat ini dimaksudkan

untuk mempercepat laju pembentukan radikal hidroksil dengan cara mereduksi besi dan mempertahankan penyediaan Fe(III).

Reaksi:



Senyawa karbonil yang dihasilkan diukur dengan metoda DNPH yang dimodifikasi (Uchida dkk, 1998; Sadikin & Adiyanto, 2001). Warna yang dihasilkan diukur serapannya pada panjang gelombang 390 nm. Aktivitas penangkapan radikal hidroksil dinyatakan dengan persen dan dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ penangkapan} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%$$

Pengukuran aktivitas *Chelating* logam (dinis method) (Gulcin dkk, 2004).

Aktivitas *chelating* logam diukur dengan cara dibuat dua jenis larutan terlebih dahulu, yakni larutan kontrol dan uji. Larutan kontrol (A0) terdiri atas campuran 0,05 ml $FeCl_2$ 2 mM dan ditambahkan 0,2 ml o-fenantrolin sampai homogen. Campuran ini dibiarkan selama 10 menit, kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada $\lambda=562$ nm. Sementara itu, larutan uji (A1) dibuat dengan menambahkan sejumlah larutan yang akan diuji, pada campuran 0,05 ml $FeCl_2$ 2 mM dan 0,2 ml o-fenantrolin. Larutan dicampur sampai homogen, kemudian dibiarkan selama 10 menit. Absorbansinya diukur dengan spektrofotometer pada $\lambda=562$ nm. Perhitungan:

$$\% \text{ Penghambatan} = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100\%$$

Pengukuran Scavenging Hidrogen peroksida (Ruch method) (Gulcin dkk, 2004).

Aktivitas penangkapan hidrogen peroksida diukur dengan cara dibuat dua jenis larutan terlebih dahulu, yakni larutan kontrol dan uji. Larutan kontrol (A0) terdiri atas 0,6 ml H_2O_2 40 mM dalam buffer fosfat pH 7,4. Setelah 10 menit, absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada $\lambda=230$ nm. Sementara itu, larutan uji (A1) dibuat dengan cara menambahkan sejumlah larutan yang akan diuji,

pada 0,6 ml H₂O₂ 40 mM dalam buffer fosfat pH 7,4. Setelah 10 menit, absorbansi diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada $\lambda=230$ nm dengan buffer fosfat pH 7,4. Perhitungan:

$$\% \text{ Scavenging H}_2\text{O}_2 = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100\%$$

Pengukuran *Advanced Oxidation Protein Products* (AOPP) yang dimodifikasi

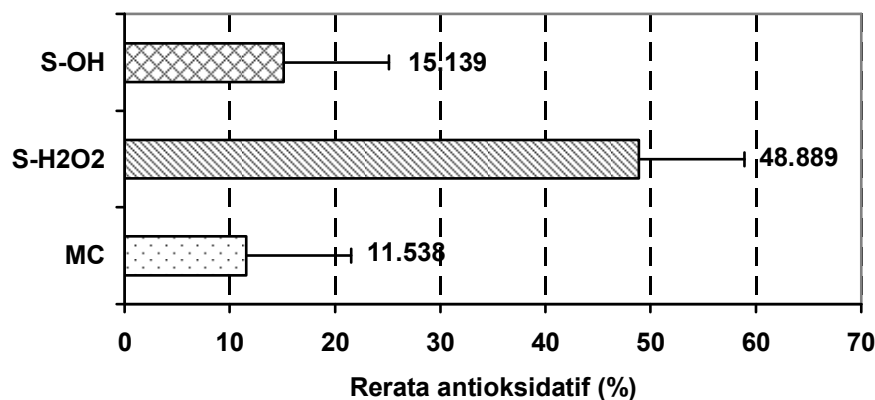
Pengukuran AOPP yang dimodifikasi (Cakatay dkk, 2003) dilakukan dengan cara mencampurkan 3 ml serum dengan 800 μ L PBS dan 100 μ L KI 1,16M. Setelah 2 menit, ditambahkan 200 μ L, kemudian absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada $\lambda=340$ nm.

Analisis data

Data pengujian antiglikosilasi yang diperoleh diuji dengan uji ANAVA pada $\alpha=5\%$. Apabila terdapat perbedaan dilanjutkan dengan uji Tuckey HSD. Data dianalisis dengan bantuan program SPSS versi 11.

HASIL

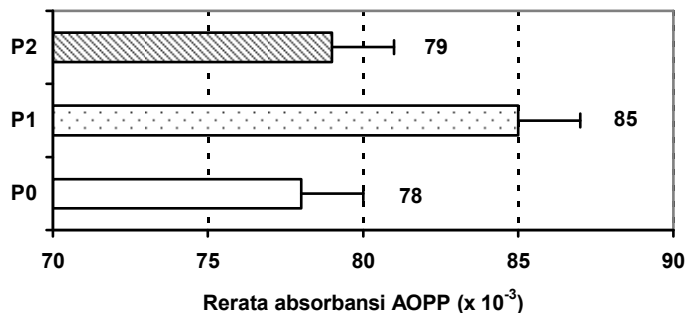
Pengukuran aktivitas antioksidatif etinil estradiol dikerjakan dengan pengulangan masing-masing sebanyak enam kali. Berdasarkan hasil pengukuran, diperoleh kemampuan antioksidatif etinil estradiol seperti disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Rerata aktivitas antioksidatif etinil estradiol (Ket: S-OH=scavenging radikal hidroksil, S-H₂O₂=scavenging hidrogen peroksida, MC=metal chelating)

Rerata aktivitas antioksidatif etinil estradiol sebagai scavenger radikal hidroksil, scavenger hidrogen peroksida dan chelating logam berturut-turut sebesar 15,139%, 48,889%, dan 11,538%. Selanjutnya, kemampuan etinil estradiol dalam

penghambatan pembentukan AOPP tersaji pada Gambar 2. Berdasarkan uji ANAVA, kelompok P0 berbeda bermakna dengan P1 ($p<0,05$), sedangkan P0 tidak berbeda dengan P2 ($p>0,05$). Sementara itu, P1 berbeda bermakna dengan P2 ($p<0,05$).



Gambar 2. Rerata absorbansi AOPP pada berbagai kelompok perlakuan (Ket: P0 = 3 ml serum; P1 = 3 ml serum + 3 ml glukosa 500mM, dan P2 = 3 ml serum + 3 ml glukosa 500 mM + etinil estradiol 0,15 gr/100 mL)

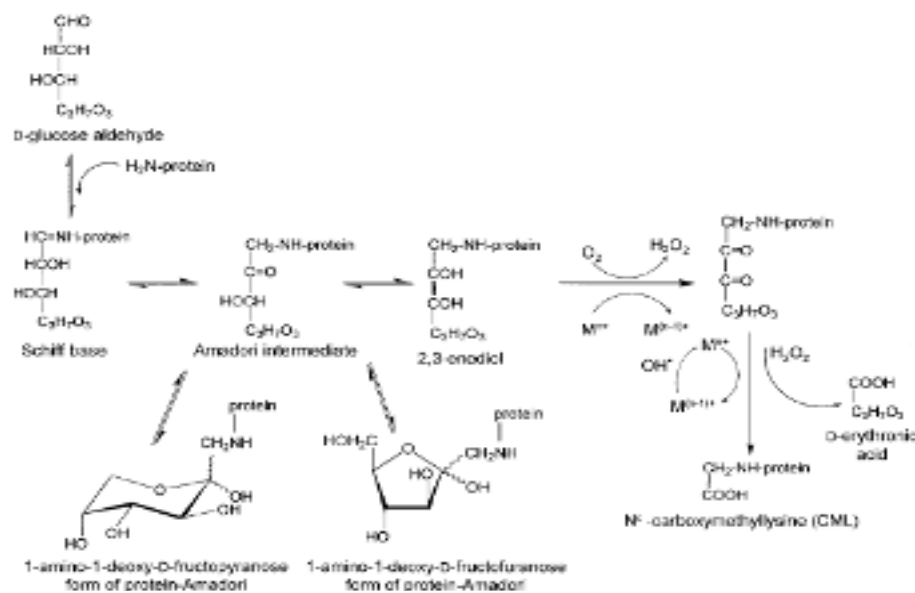
PEMBAHASAN

Advanced Oxidation Protein Products (AOPP) merupakan sekelompok senyawa yang mengandung ditirosin, yang terbentuk akibat *cross linking* pada protein (Alderman dkk, 2002). Pembentukan molekul ditirosin dan *cross linking* pada protein tersebut terkait dengan pembentukan *Advanced Glycation End Products (AGEs)* (Witko-Sarsat dkk, 1999; Kaneda dkk, 2002), yakni produk akhir reaksi glikosilasi non enzimatis (Baynes & Thorpe, 1999).

Pada tahap awal, glukosa (atau gula pereduksi yang lain, misalnya fruktosa, pentosa, galaktosa, manosa, askorbat, xilulosa) bereaksi dengan gugus amina (-NH_2) bebas dari protein, asam nukleat atau lipid membentuk senyawa aldimin

tidak stabil, yang merupakan basa Schiff. Selanjutnya, basa Schiff akan menata ulang membentuk senyawa ketoamin stabil, yaitu suatu produk Amadori. Pada tahap *intermediate*, produk Amadori akan mengalami degradasi melalui reaksi oksidasi dan dehidrasi, sehingga menyebabkan modifikasi protein (Lapolla dkk, 2005).

Selanjutnya, modifikasi protein akan dapat meningkatkan kerusakan biomolekul, terlebih dengan adanya senyawa oksigen reaktif (SOR). Dengan demikian, agar kerusakan biomolekul tidak berkelanjutan, diperlukan senyawa antioksidan untuk menghambatnya. Pada penelitian ini, kemampuan antioksidatif etinil estradiol telah terbukti menghambat pembentukan AOPP.



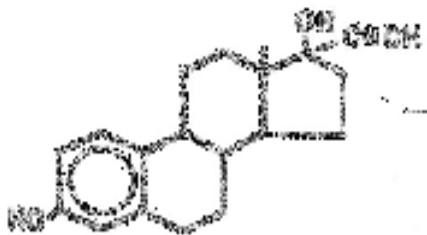
Gambar 3. Mekanisme pembentukan modifikasi protein yang melibatkan jalur oksidatif reaksi glikosilasi (Voziyan dkk, 2003)

Merujuk pada Gambar 3, mekanisme etinil estradiol dalam menghambat pembentukan AOPP akibat reaksi glikosilasi diduga disebabkan oleh beberapa mekanisme, yang bekerja secara sinergis. Mekanisme tersebut antara lain:

1. Etinil estradiol mempunyai kemampuan mengikat logam M^{n+} yang mengkatalisis pembentukan modifikasi protein. Meskipun kemampuannya hanya 11,538%, akan tetapi mampu menurunkan pembentukan AOPP.
2. Selain dapat mengikat logam, etinil estradiol juga dapat mengikat H_2O_2 dengan aktivitas 48,889%. Kemampuannya ini menyebabkan oksidasi 2,3-enediol menjadi protein termodifikasi menjadi terhambat, sehingga AOPP juga lebih rendah.

3. Etinil estradiol juga memiliki kemampuan menangkap radikal bebas hidroksil 15,139%. Pada penelitian ini diungkap bahwa etinil estradiol mempunyai aktivitas *scavenger* dan *chelating*. Aktivitas ini didukung oleh penelitian Ruiz-Larea dkk (2000), yang membuktikan bahwa etinil estradiol berperan sebagai donor hidrogen membentuk radikal fenoksil estrogen. Selanjutnya, radikal fenoksil estrogen yang terbentuk bersifat jangka panjang dan akan distabilkan oleh delokalisasi internal akibat defisiensi elektron yang melingkupi struktur aromatikanya. Penelitian ini didukung oleh penelitian sebelumnya yang membuktikan adanya peran senyawa antioksidan dalam penghambatan reaksi glikosilasi

(Suhartono dkk, 2004a; Suhartono dkk, 2005a; Suhartono dkk, 2005b).



Gambar 4. Struktur etinilestradiol (Ruiz-Larrea dkk, 2000).

4. Penghambatan degradasi tirosin yang menyebabkan berkurangnya degradasi tirosin akibat modifikasi oksidatif protein. Modifikasi oksidatif protein disebabkan oleh oksidan yang terbentuk pada reaksi glikooksidasi. Hal ini didukung oleh penelitian Suhartono dkk (2004b), yang mengungkapkan bahwa secara *in vitro*, model reaksi glikosilasi mampu meningkatkan degradasi tirosin sesuai dengan lama inkubasi. Dengan kata lain, etinil estradiol mampu menghambat pembentukan AOPP akibat degradasi tirosin. Selain itu, penghambatan antioksidan terhadap oksidasi protein akibat reaksi glikosilasi telah dibuktikan pada penelitian sebelumnya (Budianto dkk, 2003; Damayanthi dkk, 2003; Firdaus dkk, 2004; Budianto dkk, 2004; Suhartono dkk, 2004b, Suhartono dkk, 2005c; Suhartono dkk, 2005d).

KESIMPULAN

Beberapa kesimpulan yang dapat dipetik dari penelitian ini adalah:

1. Aktivitas antioksidatif etinil estradiol dalam scavenging H_2O_2 , scavenging $\cdot OH$, dan chelating logam sebesar 48,889%, 15,139%, 11,538%.
2. Etinil estradiol mampu menghambat pembentukan *Advanced Oxidation Protein Products* akibat reaksi glikosilasi secara bermakna.

KEPUSTAKAAN

Adenan 2005. Risiko penyakit jantung koroner pada wanita pemakai pil kombinasi. *Berkala Kedokteran*. 4:158-64.
 Alderman CJJ, Shah S, Foreman JC, Chain BM, Katz DR 2002. The role of advanced oxidation protein products in regulation of dendritic cell function. *Free Rad. Biol. Med.* 32:377-85.
 Budianto R, Qamariah N, Suhartono E 2003. Potensi infus daun pare (*Momordica charantia*) sebagai penghambat kerusakan protein akibat glikosilasi secara *in vitro*. *Majalah Obat Tradisional*. 8(25):1-5.
 Budianto R, Firdaus RT, Paramita D, Vianti TA, Damayanthi ED, Suhartono E 2004. Uji antioksidan tumbuhan pasak bumi (*Eurycoma Longifolia* Jack.) serta perannya sebagai inhibitor

kerusakan protein akibat reaksi glikosilasi. *Review Kimia*, 7(2):89-97.
 Baynes JW, Thorpe SR 1999. Role of oxidative stress in diabetic complication—a new perspective on an old paradigm. *Diabetes*. 48:1-9.
 Cakatay U, Telcy A, Kayali R, Tekeli F, Akcay T, Silvas A 2003. Relation of aging with oxidative protein damage parameters in the rat skeletal muscle. *Clin. Biochem*. 36:51-5.
 Damayanthi ED, Suhartono E, Qamariah N 2003. Penghambatan kerusakan protein oleh infus batang tanaman brotowali (*Tinospora crispa* L.Miers) akibat konsentrasi glukosa berlebih secara *in vitro*. *Berkala Kedokteran*, 3(1):27-32.
 Firdaus RT, Suhartono E, Qamariah N 2004. Pemodelan reaksi glikosilasi dan peran infus daun tapak dara (*Catharantus roseus* [L] G.Don) sebagai penghambat kerusakan protein. *Berkala Ilmu Kedokteran*, 36(1):1-6.
 Gulcin I, Kufrevioglu I, Oktay M, Buyukokuroglu ME 2004. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer, and analgesic activity of nettle (*Urtica dioica* L.). *J. Ethnopharmacology*. 90:205-15.
 Hall G, Phillips TJ 2005. Estrogen and skin: the effects of estrogen, menopause, nad hormone replacement therapy on skin. *J. Am. Acad. Dermatol*. 53:555-68.
 Kaneda H, Taguchi J, Ogasawara K, Aizawa T, Ohno M 2002. Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 162:221-5.
 Lapolla A, Traldi P, Fedele D 2005. Importance of measuring products of non-enzymatic glycation proteins. *Clin. Biochem*. 38:103-15.
 Ozden S, Dildar K, Kadir YH, Gulizar K 2001. The effects of hormone replacement therapy on lipid peroxidation and antioxidant status. *Maturitas*. 38:165-70.
 Ruiz-Larrea MB, Martin C, Martinez R, Navarro R, Lacort M, Miller Nj 2000. Antioxidant activities of estrogens against aqueous and lipophilic radical; differences between phenol and catechol estrogens. *Chem. Phys. Lipid* 105:179-88.
 Santanam N, Shern-Brewer R, McClatchey R, Castellano PZ, Murphy AA, Voelkel S, Parthasarathy 1998. Estradiol as an antioxidant: incompatible with its physiological concentrations and function. *J. Lipid Res*. 39:2111-8.
 Sadikin M, Adhiyanto C 2001. Pengukuran konsentrasi senyawa dikarbonil dalam Kumpulan makalah Pelatihan Radikal Bebas dan Antioksidan dalam kesehatan. Bagian Biokimia FK UI, Jakarta.
 Suhartono E, Setiawan B, Edyson, Sari NY 2004a, Uji aktivitas antioksidan rebusan Daun Dewa (*Gynura Pseudochina*) dan perannya sebagai inhibitor *Advanced Glycation End Products* (AGEs) akibat reaksi glikosilasi. *J. Mutiara. Med*. 4(2):104-13.
 Suhartono E, Setiawan B, Edyson, Mashuri 2004b. Modifikasi protein akibat reaksi Maillard dan pengaruhnya terhadap kadar tirosin. *Profesi Medika*. 4(2):20-7.
 Suhartono E, Setiawan B, Edyson, Ramlah 2005a. Uji aktivitas antioksidan jus buah mengkudu (*Morinda citrifolia*) dan perannya sebagai inhibitor *Advanced Glycation End Products* (AGEs) akibat reaksi glikosilasi. *Berkala Ilmu Kedokteran*. 37(1):1-6.
 Suhartono E, Setiawan B, Rohman T, Dedy O 2005b. Laju inhibisi *Advanced Glycation End Products* (AGEs) oleh perasan buah belimbing wuluh (*Averrhoa Bilimbi* Linn.) berdasarkan aktivitas antioksidannya *in vitro*. *Majalah Obat Tradisional*. 10(31):7-11.
 Suhartono E, Setiawan B, Mashuri 2005c. Model pembentukan *Advanced Glycation End Products* (AGEs) dan degradasi tirosin akibat reaksi Maillard. *Jurnal Kedokteran YARSI*. 13(1):50-5.
 Suhartono E, Rohman T, Setiawan B, Primasari AA 2005d. Model pembentukan *Advanced Glycation End Products* (AGEs) dan

- modifikasi protein akibat reaksi glikosilasi. Maj. Kedokt. Indon. 55(11):681-5.
- Uchida K, Kanematsu M, Sakai K, Matsuda T, Hattori N, Mizuno Y 1998. Protein bound acrolein: potential markers for oxidative stress. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95:4882-7.
- Voziyan PA, Khalifah RG, Thibaudeau C, Yildiz A, Jacob J, Serianni AS 2003. Modification of proteins in vitro by physiological levels of glucose. J. Biol. Chem. 278:46616-24.
- Wen Y, Doyle MCT, Cooke T, Feely J 2000. Effect of menopause on low-density lipoprotein oxidation: is oestrogen an important determinant. Maturitas. 34:233-8.
- Wilbraham AC, Matta MS 1992. Kimia organik dan hayati. Bandung: Penerbit ITB.
- Witko-Sarsat V, Nguyen-Khoa T, Jungers P, Drueke TB, Descamps-Latscha B. 1999. Advanced oxidation protein products as a novel molecular basis of oxidative stress in uraemia. Nephrol. Dial. Transplant. 14:76-8.